

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1935

N°

THÈSE 526

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

PAR

Louis PETIT

Né le 10 Juin 1907, à Paris

**Recherche et numération
du colibacille dans les eaux**

Président de Thèse : M. TANON, Professeur

PARIS

LIBRAIRIE LIPSCHUTZ

4, Place de l'Odéon

1935

ANNÉE 1935

N°

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

PAR

Louis PETIT

Né le 10 Juin 1907, à Paris

Recherche et numération du colibacille dans les eaux

Président de Thèse : M. TANON, Professeur

PARIS

LIBRAIRIE LIPSCHUTZ

4, Place de l'Odéon

1935

I. — PROFESSEURS

Anatomie
 Physiologie
 Physique médicale
 Chimie médicale
 Bactériologie
 Parasitologie et histoire naturelle médicale
 Pathologie médicale et générale
 Pathologie chirurgicale
 Anatomie pathologique
 Histologie
 Pharmacologie et matière médicale
 Thérapeutique
 Hygiène et médecine préventive
 Médecine légale
 Histoire de la médecine et de la chirurgie
 Pathologie expérimentale et comparée
 Hydrologie thérapeutique et climatologie

Clinique médicale

Hygiène et clinique de la première enfance
 Clinique des maladies des enfants
 Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encé-
 phale
 Clinique des maladies cutanées et syphilitiques
 Clinique des maladies du système nerveux
 Clinique des maladies infectieuses

Clinique chirurgicale

Clinique ophtalmologique

Clinique urologique

Clinique d'accouchements

Clinique gynécologique

Clinique chirurgicale infantile et orthopédie

Clinique thérapeutique médicale

Clinique oto-rhino-laryngologique

Clinique thérapeutique chirurgicale

Clinique propédeutique

Clinique de la Tuberculose

Clinique chirurgicale orthopédique de l'adulte

Professeurs sans chaire

MM.

ROUVIERE.
 Léon BINET.
 STROHL.
 DESGREZ.
 Robert DEBRE.
 BRUMPT.
 BAUDOIN.
 CHEVASSU.
 ROUSSY
 CHAMPY.
 TIFFENEAU.
 HARVIER
 TANON.
 BALTHAZARD.
 LAIGNEL-LAVASTINE
 FIESSINGER.
 Maurice VILLARET.
 LOEPER.
 CARNOT.
 CLERC.
 Marcel LABBE.
 LEREBoullet.
 NOBECOURT.

H. CLAUDE.
 GOUGEROT
 GUILLAIN.
 LEMIERRE.
 CUNEO.
 GOSSET.
 GREGOIRE.
 LENORMANT.
 TERRIEN.
 MARION.
 BRINDEAU.
 COUVELAIRE.
 JEANNIN.
 PROUST.
 OMBREDANNE.
 RATHERY.
 LEMAITRE.
 Pierre DUVAL.
 SERGENT.
 BEZANCON.
 MATHIEU.
 HOVELACQUE.
 MULON.
 OLIVIER.
 VERNE.
 MOCQUOT.



II. — AGREGES EN EXERCICE

MM.

BENARD (Henri). Pathologie médicale.
 BERNARD (Et.) .. Pathologie médicale.
 BOULIN Pathologie médicale.
 BULLIARD Histologie.
 CATHALA Pathologie médicale.
 CHEVALLIER ... Pathologie médicale.
 DOGNON Physique.
 FEY Urologie.
 GALLIARD Parasitologie.
 GASTINEL Bactériologie.
 DE GAUDART
 D'ALLAINES Pathologie chirurgicale.
 GAYET Physiologie.
 GIROUD Histologie.
 HAGUENAU Pathologie médicale.
 HALPHEN Oto-rhino-laryngologie.
 HAZARD Pharmacologie.
 HUGUENIN Anatomie pathologique
 JOANNON Hygiène.
 LABBE (Henri) .. Chimie biologique.
 LACOMME Obstétrique.
 LANTUEJOUL ... Obstétrique.

MM.

LAROCHE (Guy) .. Pathologie médicale
 LEMAIRE Pathologie expérimentale.
 LEVEUF Pathologie chirurgicale.
 Mlle J. LEVY Pharmacologie.
 LEVY-VALENSI .. Neurologie et Psychiatrie.
 MOREAU Pathologie médicale.
 MOULONGUET .. Pathologie chirurgicale.
 MOUQUIN Pathologie médicale.
 OBERLING Anatomie pathologique.
 PETITDUTAILLIS Pathologie chirurgicale
 PIEDELIEVRE ... Médecine Légale
 PORTES Obstétrique.
 RICHET Physiologie.
 SANNIE Chimie biologique.
 SENEQUE Pathologie chirurgicale.
 TROISIER Pathologie expérimentale.
 TURPIN Pathologie médicale.
 VIGNES Obstétrique.
 WILMOTH Pathologie chirurgicale.

III. — AGREGES RAPPELES A L'EXERCICE

pour le service des examens

MM.

ALGLAVE Pathologie chirurgicale.
 BUSQUET Pharmacologie.
 CHAILLEY-BERT, Physiologie.

MM.

LEROUX Anatomie pathologique.
 NEVEU-LEMAIRE Parasitologie.
 ZIMMERN Physique.

IV. — AGREGES CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE à titre permanent

MM.		MM.	
ABRAMI	Clinique médicale.	BASSET	Clinique chirurgicale.
ALAJOUANINE ..		BROCQ	
AUBERTIN		CADENAT	
BRULE		GATELLIER	
CHABROL		HEITZ-BOYER ...	
CHIRAY		MOURE	
DONZELOT		QUENU	
DUVOIR		SCHWARTZ	
LIAN		VELTER	
PASTEUR-VALLE			
RY-RADOT			
SEZARY			

MM.	
ECALLE	Clinique obstétricale.
GUENIOT	
LE LORIER	
LEVY-SOLAL	
METZGER	

V. — CHARGES DE COURS

MM.	
CHAILLEY-BERT, agrégé	Education physique.
LEDoux-LEBARD	Radiologie clinique.
WEIL-HALLE	Puériculture.

Par délibération en date du 9 décembre 1798 l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A LA MÉMOIRE DE MA SŒUR

A MA MÈRE

A MA SŒUR
A MA BELLE-SŒUR

A MES FRÈRES
A MON BEAU-FRÈRE

A TOUTE MA FAMILLE

A MES AMIS

A M. LE PROFESSEUR TANON

Membre de l'Académie de Médecine de Paris
Professeur d'hygiène à la Faculté de Médecine de Paris
Conseiller technique sanitaire au
Ministère de la Santé Publique
Inspecteur général des services techniques
d'hygiène à la Préfecture de Police
Officier de la Légion d'honneur

Qui a bien voulu nous faire l'honneur
d'accepter la présidence de cette thèse.

A M. LE DOCTEUR DUVIC

Directeur des Services d'Hygiène de la Vendée
Médecin-Chef du Laboratoire départemental

Qui a bien voulu nous inspirer ce travail, avec toute notre affectueuses reconnaissance.

A mes Maîtres de l'Ecole de plein exercice
de Médecine et de Pharmacie de Nantes

INTRODUCTION

La qualité des eaux destinées à l'alimentation est généralement appréciée ou contrôlée par différentes méthodes bactériologiques (numération et identification des micro-organismes vivant dans ces eaux, recherche élective des espèces pathogènes ou de certaines espèces considérées à bon droit comme des tests indubitables de pollution).

Parmi ces méthodes, la colimétrie, ou détermination du nombre des colibacilles contenus dans une certaine quantité de l'eau considérée, a pris une importance de tout premier plan.

Les difficultés multiples qu'éprouve l'analyste à mettre en évidence les microbes des maladies dites « hydriques » l'obligent à fonder le diagnostic de pollution d'une eau moins sur la présence de ces microbes que sur l'existence d'autres bactéries infiniment plus nombreuses et plus constamment rencontrées.

S'il est exact que le Bacille d'Eberth, par exemple, est fréquemment absent des eaux qui contiennent du

Bacterium Coli, il n'en est pas moins vrai que celui-ci ne manquera jamais de pulluler dans une eau capable de véhiculer l'agent causal de la fièvre typhoïde.

D'autre part, une eau habituellement exempte de Coli, dans laquelle ce bacille apparaît tout à coup, devient bien suspecte de contamination fécale et comme telle susceptible de se charger à la première occasion de germes intestinaux pathogènes.

Enfin, la possibilité de *doser* le microbe témoin de pollution présente le plus haut intérêt parce qu'elle permet de classer de façon relativement rapide l'eau considérée dans la catégorie inhérente à sa qualité (pure, assez pure, passable, suspecte, médiocre ou nettement impure) ou bien encore d'apprécier les variations subies par cette qualité dans le temps, ce qui est particulièrement précieux pour la surveillance des sources captées et le contrôle répété des méthodes de stérilisation.

Rien de surprenant, donc, à ce que les bactériologistes se soient attachés à découvrir des méthodes de colimétrie donnant une précision toujours plus grande, associée à une rapidité de manipulation sans cesse accrue.

Mais les procédés de colimétrie se heurtent, eux aussi, à de sérieuses difficultés, dont la principale est la coexistence de développement de germes banaux,

qui vient gêner ou masquer le développement du *Bacterium Coli*.

Toutes les méthodes employées visent à éliminer ces bactéries ou à caractériser le colibacille par une réaction spécifique. Par l'emploi d'antiseptiques ou de matières colorantes, on s'efforce de créer un milieu dans lequel le *Bacterium Coli* se développe seul, afin d'en obtenir, à coup sûr, une culture pure. D'autres font appel à des réactions colorées destinées à mettre en évidence ce germe, ou utilisent des propriétés biologiques propres aux cultures de colibacilles.

Parmi tant de méthodes laquelle choisir pour obtenir d'une façon pratique un résultat rapide et exact ?

Nous nous sommes efforcé d'étudier certaines de ces méthodes parmi les plus couramment employées. Ensuite nous basant sur nos observations, en procédant différemment, nous avons essayé d'obtenir rapidement des réponses sans conteste sur la qualité des eaux à analyser.

Cet ouvrage comporte deux parties :

Une première est faite de l'exposé de tous les procédés de recherche et de numération du colibacille que nous avons pu réunir.

Une deuxième est constituée par l'exposé d'un certain nombre d'expériences portant sur la « con-

centration des germes », l'action des antiseptiques, les procédés simplifiés (eau lactosée, Indol, méthode de Besson) ; un chapitre enfin sera consacré à l'exposé de notre méthode personnelle. Pour terminer, dans nos conclusions, nous repasserons en revue tous les résultats que nous aurons trouvés.

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE PREMIER

LES PROCEDES DE COLIMETRIE

§ I. — *Procédés anciens*

I. — *Procédé de Rodet.* — Il est basé sur le fait que le colibacille et les bacilles typhiques se développent rapidement à 45° alors que la plupart des autres bactéries ne cultivent pas à cette température.

20 à 100 cc. de l'eau à analyser sont versés dans un bouillon stérilisé et mis ensuite à l'étuve à 45°. Au bout de 20 à 24 h., si le bouillon se trouble, on admet que ce trouble est dû presque certainement à du colibacille.

Un examen de la culture ou, au besoin, un isolement sur gélatine permet de lever les doutes.

Ce procédé ne peut fournir des résultats suffisants ; il est surtout employé en combinaison avec d'autres propriétés.

II. — *Procédé de Chantemesse et Widal.* — Après avoir montré que le colibacille et les bacilles typhiques se développent dans les milieux de culture additionnés de 1 p. 400 d'acide phénique, et que cette addi-

tion a la propriété d'empêcher la pullulation de la plupart des autres germes, ces auteurs proposent la technique suivante :

Quelques gouttes d'eau sont ajoutées à des tubes contenant 20 cc. de gélatine liquéfiée et 1 cc. de solution phéniquée à 5 p. 100 ; on coule ensuite sur boîtes de Pétri.

Le développement d'un certain nombre de bactéries liquéfiantes vient, en général, entraver rapidement les recherches.

Etant donné la petite quantité d'eauensemencée pour chaque analyse un grand nombre de plaques sera nécessaire.

III. — *Procédé de Vincent.* — Combine les deux méthodes précédentes : l'auteur pratique des ensemencements dans du bouillon phéniqué à 10 p. 1.000 et cultive à une température de 41°5-42°.

Actuellement on n'utilise plus de bouillon, on rend l'eau directement nutritive en l'additionnant de la solution concentrée de peptone :

peptone	50 grammes
sel marin	25
eau	100

à raison de 1 cc. pour 50 cc. d'eau ; l'eau obtenue est donc au taux de 1 pour 100.

Les petits volumes 5 cc., 2 cc., 1 cc. et au-dessous

sont ensemencés dans des tubes stériles contenant 10 cc. d'eau peptonée à 1 p. 100 ; les volumes plus élevés, 10 cc. 20 cc., 50 cc., 100 cc., etc., sont directement introduits dans des tubes, des fioles ou des matras stériles.

On phénique ensuite à 0,85 pour 1000 en utilisant une solution d'acide phénique à 5 p. 100. Pratiquement on obtient un mélange conforme en laissant tomber, à l'aide d'une pipette jaugeant XXX gouttes au gramme, 1 goutte de solution pour 2 cc. du volume total.

On agite, on porte à l'étuve à 41°5. Les cultures sont vérifiées après 16 ou 20 h. On pourrait, d'après leur résultat, conclure à la présence ou à l'absence de colibacille dans une certaine quantité d'eau.

On procède à un repiquage en tubes d'eau peptonée phéniquée que l'on remplace à 41°5.

D'après Vincent, ce second passage donnerait, en général, une culture pure de colibacille.

Presque toujours il est nécessaire de faire, au bout de quelques heures, un deuxième repiquage dans les mêmes conditions.

Un trouble homogène avec ondes soyeuses serait le signe de la présence de colibacille dans la dilution considérée.

Pour obtenir une certitude, il sera indispensable de faire l'examen microscopique et d'identifier le

germe en eau peptonée, en eau peptonée au rouge neutre, en lait tournesolé, sur gélose lactosée tournesolée.

Cette méthode a soulevé beaucoup de critiques. Il est certain que beaucoup de germes ne sont pas — ou peu — sensibles à l'action de l'acide phénique; on cite le *Bacillus Subtilis*, le *Bacillus Mesentericus*, le *Bacillus luteus*, le *Streptocoque blanc* de l'eau, le *Proteus vulgaris*. Souvent on ne peut s'en débarrasser par des passages successifs en milieux phéniqués; une fois qu'ils y sont accoutumés, ils se développent aussi bien, sinon beaucoup mieux, que le *Colibacille*, et nous fournirons toujours, dans nos cultures, des troubles.

Au contraire, ces passages successifs font fréquemment perdre le germe recherché; l'isolement, toujours obligatoire, ne vient que lorsque tous les germes ont pullulé et masquent le *B. Coli*.

IV. — *Procédé de Diénert et Guillerd*. — Utilise la même technique que précédemment, mais remplace l'eau peptonée par l'eau de levure autolysée.

Eau de levure (dilution normale) . . . 20 cc.

Eau stérile 30 cc.

Eau d'ensemencement 50 cc.

qui nous donne une eau de levure au 1/5.

V. — *Procédé de Péré*. — Modification du procédé de Vincent primitif. Il permettait l'ensemencement d'une grande quantité d'eau.

Un bouillon est réparti dans des fioles de Vivien à raison de 50 cc. par récipient.

On stérilise et on ajoute à chaque fiole 3 cc. de solution phéniquée à 5 pour 100 et l'eau à analyser pour un volume total de 150 cc. On répète l'opération sur cinq à six fioles. On place à 41°5.

Dès qu'un trouble se produit (quinzième ou vingtième heure), on ensemence avec le contenu des fioles des tubes de bouillon phéniqué à 1 pour 1.000. On replace à 41°5 et on termine comme dans le procédé de Vincent.

Ce procédé est évidemment sujet aux mêmes critiques que la méthode dont il dérive.

VI. — *Procédé de Pouchet et Bonjean.* — Inspiré du procédé Vincent, sa technique est la suivante :

Dans des ballons contenant 100 cc. de bouillon stérilisé, verser 150 cc. d'eau à analyser et 5 cc. de solution phéniquée à 5 pour 100. Porter à l'étuve à 42°, puis ensemencer en bouillon ordinaire.

Après huit jours de séjour à 36°, cette culture est inoculée à un cobaye à raison de 0 cc. 3 par 100 gr. d'animal. Si le cobaye succombe, on fait des cultures avec le sang du cœur, la pulpe des viscères, etc...

Il est évident qu'une telle méthode, en dehors de toute critique théorique, ne peut être employée pratiquement pour une analyse d'eau. D'ailleurs elle ne

recherche de Colibacille que qualitativement et ne constitue pas, à proprement parler, un procédé de Colimétrie.

§ II. — *Procédé d'Elsner et ses dérivés*

I. — *Procédé d'Elsner.* — Il est basé sur le principe d'un milieu sélectif; le Colibacille se développerait à l'exclusion de tout autre germe sur une gelée de pomme de terre additionnée d'iodure de potassium.

On pèle et on râpe avec soin 500 gr. de pommes de terre crues; la pulpe obtenue est mise à macérer quatre heures dans un litre d'eau; on tamise et on laisse déposer toute une nuit dans un endroit frais. Ensuite on décante et on additionne le liquide de 150 à 250 grammes de gélatine que l'on a fait dissoudre à feu doux. Avec une solution de bicarbonate de soude, on diminue l'acidité du milieu jusqu'à réaction faiblement acide au tournesol. On filtre et on stérilise après répartition par fractions de 100 grammes dans des matras.

Avant l'usage, on ajoute à chaque ballon 1 gramme d'iodure de potassium dissout et stérilisé dans une petite quantité d'eau; on mélange et on distribue cette gélatine iodurée à 1 p. 100 dans des tubes à essai.

L'ensemencement se fera en ajoutant à la gélatine

fondue 0 cc. 5 à 1 cc. d'eau; le contenu des tubes est ensuite coulé sur boîtes de Pétri.

D'après Elsner, sur ce milieu, le Colibacille donnerait en 48 heures, à 22°, des colonies arrondies, opaques et légèrement brunâtres; le Bacille d'Eberth fournit après quatre jours des colonies plus petites, transparentes, presque invisibles. La différenciation serait facile, les autres bactéries ne se développeraient pas.

En réalité, divers germes — même des liquéfiantes — se développent sur les plaques et les caractères des colonies à Colibacilles et à Bacilles d'Eberth ne sont pas aussi différenciés que le dit l'auteur. La présence de Bactéries liquéfiantes rendra en outre la numération presque impossible ou au moins inexacte. Enfin il sera indispensable, pour être certain de l'identité des germes isolés, d'en rechercher les réactions biologiques habituelles.

II. — *Procédé de Grimbert.* — Attribuant les insuccès de la méthode d'Elsner à l'inconstance du milieu employé et à l'indétermination de son degré d'acidité, Grimbert préconise l'emploi d'une gélatine ordinaire à condition de maintenir une acidité telle que 10 cc. de milieu soient neutralisés par 5 cc. d'eau de chaux, ou mieux un milieu de composition constante :

Maltose	1 gr.	Sulfate de ma-	
Amidon soluble ..	2 gr.	gnésie	2 gr.
Asparagine	2 gr.	Binmalate d'ammo-	
Phosphate neutre		nium	2 gr.
de potassium ..	2 gr.	Carbonate de ma-	
Sulfate de potas-		gnésie	1 gr.
sium	2 gr.		

que l'on dissout dans un litre d'eau. Au mélange, on ajoute 15 pour 100 de gélatine. Clarifier au blanc d'œuf, chauffer à 115°, puis filtrer.

Ce milieu s'emploie comme celui d'Elsner; l'apparition des colonies y est plus lente; on ne voit les premières qu'à partir du troisième jour.

III. — *Procédé de Rémy.* — Emploie un milieu plus nutritif et moins acide que celui de Grimbert.

La *gélatine différentielle* de Rémy est constituée par :

Asparagine	6 gr.
Acide oxalique	0 gr. 5
Acide lactique	0 gr. 15
Acide citrique	0 gr. 15
Phosphate bisodique	5 gr.
Sulfate de potassium	1 gr. 25
Chlorure de sodium	2 gr.
Peptone Witte	30 gr.

dissouts dans un litre d'eau avec chauffage de 15 minutes à 110°. Le liquide est ensuite versé dans un

ballon contenant 150 grammes de gélatine. On ajoute une solution de soude jusqu'à alcalinisation légère. Porter quinze minutes à l'autoclave, puis acidifier avec une solution décinormale d'acide sulfurique, de façon que 10 cc. de gélatine aient une acidité neutralisée par 0 cc. 2 de solution demi-normale de soude. Ensuite, on fait dissoudre 2 gr. 50 de sulfate de magnésie par litre de gélatine; on répartit en tubes par fractions de 10 cc.; on stérilise par trois chauffages à 100°.

Avant l'emploi, introduire dans chaque tube 1 cc. de solution de lactose à 35 pour 100 et 0 cc. 1 de solution phéniquée à 2,5 pour 100.

Le milieu s'emploie comme la gélatine d'Elsner. On conseille de préparer d'abord un mélange de bouillon et d'eau suspecte, additionné de 0,5 pour 100 d'acide sulfurique et d'acide phénique. Le mélange est placé 24 heures à 30°, puis il sert à ensementer, par la méthode des dilutions successives, les plaques de gélatine.

Les colonies apparaissent au deuxième jour.

Pour le Bacille Coli, les colonies profondes sont arrondies, ovoïdes ou fusiformes, colorées en brun jaunâtre avec parfois de fines bulles de gaz. Les colonies superficielles, transparentes et bleutées au début, deviennent rapidement opaques; certaines restent glo-

buleuses, brun jaunâtre; d'autres sont étalées à contours irréguliers.

Pour le Bacille d'Eberth, les colonies profondes sont blanc bleuté, plus petites que les colonies collantes et ne donnent pas de dégagement gazeux. Bien visibles seulement au troisième jour, les colonies superficielles rappellent au début l'aspect des moisissures; elles s'étalent ensuite, prennent une teinte bleutée et peuvent atteindre 2 à 3 cm. de diamètre.

Ce milieu, si long à préparer, n'est pas plus sélectif que celui d'Elsner; les divers germes y poussent, même les espèces liquéfiantes. Il soulève donc les mêmes critiques que le procédé d'Elsner.

IV. — *Premier procédé de Besson.* — Dérive également de celui d'Elsner; il présente l'avantage d'ensemencer de notables quantités d'eau; s'adressant à des milieux liquides, les bactéries liquéfiantes, qui viennent arrêter la recherche dans les méthodes précédentes, sont peu gênantes. Le procédé éliminerait d'ailleurs la plupart des germes banaux.

1° Préparer avec 30 grammes de peptone et 5 grammes de sel marin un litre d'eau peptonisée à 3 pour 100. Ne pas alcaliniser, porter à 115°, filtrer, répartir en tubes par 10 cc. et stériliser.

2° Au moment de l'emploi, on ajoute à chaque tube XX à XXX gouttes de solution de Gram récem-

ment préparée, puis 10 cc. de l'eau suspecte. On répète l'opération sur une dizaine de tubes.

La quantité de liqueur de Gram à ajouter varie un peu avec la composition du bouillon; les premières gouttes ajoutées se décolorent rapidement; puis vient un moment où le milieu garde une légère teinte brun rose qui disparaît en cinq à six minutes; c'est là qu'il faut arrêter l'addition de liqueur de Gram.

3° Porter à l'étuve à 37°.

Le *Coffibacille* pousse vers la huitième ou la douzième heure. Le *Bacille d'Eberth* vers la quinzième ou vingtième heure, mais tous deux avant les autres microbes.

4° Arrêter la culture vers la vingtième heure; faire avec le contenu des tubes qui ont troublé un nouveau passage en bouillon Gram.

5° Vers la quinzième ou vingtième heure, retirer de l'étuve les tubes de deuxième passage; faire avec leur contenu des isollements sur gélose lactosée tournesolée et desensemencements en bouillon ordinaire.

6° Les cultures sont examinées et les colonies identifiées par les procédés habituels.

Nous reprochons à ce procédé de pratiquer desensemencements de milieux liquides à milieux liquides. Il est bien connu que les germes qui ont survécu en premier bouillon se sont habitués au milieu et se développent bien lors des passages suivants. Ces

passages augmentent les chances d'éliminer le Coli-bacille; ils sont inutiles puisqu'on arrive sans eux à isoler le Bacille Coli sur milieu solide.

§ III. — *Les procédés dits de « concentration »*

Lors de la production d'un précipité chimique au sein d'un liquide contenant des microbes, beaucoup de ceux-ci sont entraînés mécaniquement avec le précipité. On possède, alors, sous un petit volume, les germes que renfermait le liquide.

I. — *Procédé de Vallet.* — Dans un tube stérile, on ajoute à 20 cc. d'eau suspecte IV gouttes de solution aqueuse saturée d'hyposulfite de soude et ensuite IV gouttes de solution saturée d'azotate de plomb. Il se produit un précipité qu'on centrifuge; le culot est dissous dans quelques gouttes de solution d'hyposulfite de soude et le liquide obtenu estensemencé sur gélatine d'Elsner.

Ce procédé a l'avantage sur celui d'Elsner d'ensemencer les germes contenus dans une grande quantité d'eau. Il y ajoute une manipulation supplémentaire. Il présente évidemment les mêmes inconvénients; la colimétrie proprement dite est encore plus incertaine par suite de l'ignorance du pourcentage de la concentration des germes.

II. — *Procédé de Schueder.* — Evite la centrifugation employée dans la méthode de Vallet.

Deux litres d'eau suspecte sont placés dans une haute éprouvette et additionnés de 20 cc. de solution d'hyposulfite de soude à 7,75 pour 100 et de 20 cc. de solution d'azotate de plomb à 10 pour 100. On agite, on laisse au repos 20 heures, puis on décante et on dissout le précipité dans 14 cc. de solution saturée d'hyposulfite de soude. Le liquide obtenu est ensuite ensemencé, à raison de 0 cc. 5, sur des boîtes de Pétri à la gélose lactosée tournesolée.

La méthode d'identification ne pourra donner qu'une première indication. Si les germes sont très nombreux, la fermentation du lactose se fait largement et l'on peut admettre dans la zone rouge des colonies qui ne contiennent pas de colibacilles; la colimétrie, pour cette seule raison, pourra être faussée largement.

III. — *Procédé de Ficker.* — On obtient la précipitation au moyen de sulfate de fer.

Partant d'un volume de 2 litres d'eau à analyser, on y ajoute 8 cc. de solution de soude à 10 pour 100, puis 7 cc. de solution de sulfate de fer à 10 pour 100. Après trois heures de réaction, on centrifuge le dépôt et on le dissout dans la moitié de son volume de solution de tartrate neutre de potassium à 25 pour 100.

Le produit est ensemencé ensuite sur milieu de Drigalski par la méthode des dilutions successives.

IV. — *Procédé de O. Muller.* — La précipitation a lieu au moyen de l'oxychlorure ferreux qui opère plus rapidement que le sulfate et n'exige pas l'alcalinisation de l'eau.

A trois litres d'eau, on ajoute 6 cc. de solution d'oxychlorure ferreux. Après trente minutes, on recueille le précipité sur un filtre et on ensemence directement le dépôt sur milieu de Drigalski ou des boîtes de gélose au vert malachite.

V. — *Procédé de Federolf.* — On précipite par le sulfate de fer; on ensemence ensuite trois à huit boîtes de Pétri, contenant de la gélose, pour un litre d'eau avec un demi cc. ou 1 cc. de précipité.

On compte les colonies présentant l'aspect macroscopique habituel des colonies coliennes sur gélose.

VI. — *Procédé de Bordas.* — Une bougie filtrante plonge dans le récipient d'une eau à étudier, la tétine en haut. On fait aspiration et lorsque toute l'eau a été filtrée, on lave la crasse de la bougie dans quelques centimètres cubes d'eau stérilisée.

On ensemence ensuite d'après l'une quelconque des méthodes connues.

VII. — *Procédé de Diénert et Etrillard.* — Les auteurs utilisent le milieu de Teague :

Eau distillée	1,000 cc.
Peptone Difco	10 gr.
Phosphate dipotassique	2 gr.
Gélose ou gélatine	15 gr.

ou une autre peptone en ajustant au pH 7,5.

Avant l'usage pour 100 cc., on ajoute :

Lactose à 20 pour 100 5 cc.

Eosine à 2 pour 100 2 cc.

Bleu de méthylène à 0,5 pour 100 .. 2 cc.

On coule en boîtes de Pétri à raison de 25 cc. par unité.

On concentre les germes de l'eau à l'aide d'alumine neutre contenant 70 pour 100 d'eau et préparée en faisant agir de l'ammoniaque sur une solution de sulfate d'aluminium. Cette alumine est introduite à raison de 20 cc. de suspension pour un litre d'eau. On agite et on laisse déposer deux heures dans un endroit frais. Le liquide surnageant est siphonné et le précipité centrifugé. On obtient un culot qui contient 90 à 95 0/0 des germes de l'eau primitive.

Ce culot est ajouté, à une température de 30°, à un mélange d'un tiers de gélose et de deux tiers de gélatine de Teague; on agite et on répand le mélange sur des boîtes de Pétri contenant déjà 25 cc. de gélose de Teague. On en utilise 2 cc. par plaque. On obtient ainsi un ensemencement très superficiel et à faible température.

On place à 37° et en 24 à 48 heures apparaissent des colonies.

Les colonies coliennes ont 2 à 3 mm.; par transparence, elles ont un centre bleu sombre, presque noir, couvrant plus des trois-quarts de la colonie; par réflexion au centre, une sorte de bouton surélevé, bleu noirâtre, entouré d'une rigole circulaire, la partie périphérique de la colonie prend un aspect gris métallique.

Les Bacilles du groupe lactisaérogènes ont des colonies plus larges (4 à 6 mm.), leur centre brun foncé vu par transparence est moins noir que pour le B. Coli. Par réflexion, elles apparaissent plus claires et on n'observe pas l'aspect métallique.

Le Bacille d'Eberth (forme S) donne des colonies rouges sur ce milieu; la forme R donne des colonies bleu clair.

Toutes les autres colonies ont une coloration violette ou gris bleu.

La numération se fait, après 24 heures d'incubation à 37°, en comptant seulement les colonies présentant avec netteté les caractères précédents.

Les auteurs obtiennent de bons résultats de ce procédé. La manipulation de la concentration est longue et nécessite un appareillage supplémentaire; elle introduit pour le résultat un élément d'incertitude. Ce procédé a l'avantage de mettre le Colibacille dans

de bonnes conditions de culture et de ne pas nécessiter l'intervention d'actions empêchantes : la chaleur, des antiseptiques. Il repose entièrement sur des caractères microscopiques de colonies; il ne pourra donc être pratique que si ces caractères sont nettement tranchés et permettent une lecture rapide et correcte.

§ IV. — *Procédé de Parietti*

Se base sur cette idée qu'une forte dose de semence de Bacille typhique ou de Colibacille peut triompher d'une solution phéniquée qui stérilise une petite quantité de culture.

On prépare des tubes de 10 cc. de bouillon dans lesquels on ajoute III, VI et IX gouttes (XXX gouttes au cc.) de la solution :

Acide phénique	5 gr.
Acide chlorhydrique	4 gr.
Eau distillée	100 gr.

Ces tubes sontensemencés par séries avec I, II, III, etc... gouttes d'eau suspecte. Les eaux sans Bacille typhique ou B. Coli ne troubleraient que les bouillons renfermant peu d'acide phénique et beaucoup d'eau. Si ces microbes existent, les autres bouillons présenteraient après 24 heures un trouble...

§ V. — *Procédé de Drigalski-Conradi*

Utilise comme antiseptique une solution de krystal violet dont le but est d'empêcher le développement des germes associés, tout en permettant la pousse des Bacilles Coli et des Bacilles typhiques.

On fait macérer pendant vingt-quatre heures 1.500 grammes de viande de bœuf hachée dans deux litres d'eau; puis on fait bouillir la macération une heure, on filtre, on ramène à 2 litres par addition d'eau et on ajoute :

Peptone de Witte 20 gr.

Nutrose 20 gr.

Sel marin 10 gr.

On reporte à l'ébullition, on ajoute 60 gr. d'agar, on chauffe jusqu'à dissolution et on alcalinise faiblement. Autoclave 1 heure à 120°. Filtrage à chaud et stérilisation.

On a préparé d'autre part le mélange :

Teinture de tournesol 300 cc.

Lactose 30 gr.

On mélange à 75°, en veillant toujours à l'alcalinité du milieu, en usant au besoin d'une solution de soude à 10 pour 100. On ajoute encore 4 cc. de cette solution chaude de soude et 20 cc. d'une solution chaude et stérilisée de Krystal-violet (B. de Höchst) à 0,1 pour 100.

La gélose obtenue est distribuée dans de grandes boîtes de Pétri; lesensemencements pratiqués en surface, les boîtes sont ensuite placées à l'étuve à 37°.

Sur ce milieu, le Colibacille donne des colonies opaques et rouges, le Bacille d'Eberth des colonies transparentes et bleues.

Milieu de Hagemann. — Hagemann a modifié le milieu de Drigalski de la façon suivante. Préparer :

Extrait de Liebig	10 gr.
Peptone Witte	10 gr.
Sel marin	3 gr.
Eau	600 gr.

Porter à l'ébullition. Ajouter 500 cc. de lait. Faire bouillir et ensuite faire dissoudre dans le liquide chaud 20 grammes d'agar. Porter à l'autoclave une demi-heure à 120°, puis filtrer à chaud et répartir dans des fioles d'Erlenmeyer. Stériliser.

Avant usage, ajouter dans la gélose liquéfiée de la solution de soude pour obtenir une alcalinisation légère, puis quelques centimètres cubes de teinture de tournesol et III gouttes de solution alcoolique de krystal-violet à 1 pour 100.

§ VI. — *Procédé de Endo*

La gélose nutritive, additionnée de fuchsine, est décolorée quand on y ajoute du sulfite de sodium. Si

l'on ensemence du Colibacille sur cette gélose incolore, les acides produits par le microbe amènent une recoloration du milieu. Les colonies coliennes prennent une teinte rouge, les colonies typhiques restent incolores.

Préparer un litre de bouillon peptoné, y dissoudre 30 grammes de gélose; filtrer à chaud; neutraliser exactement et ajouter 10 cc. de solution de bicarbonate de soude à 10 pour 100, puis 10 grammes de lactose et 5 cc. de solution alcoolique et saturée de fuchsine. Le milieu prend une teinte rouge. On additionne de 25 cc. de solution récente de sulfite de sodium à 10 pour 100; la décoloration commence immédiatement et est complète après une stérilisation faite après répartition dans des tubes par fractions de 15 cc.

Conservé à l'obscurité.

Au moment du besoin, on liquéfie le contenu des tubes pour le verser dans des boîtes de Pétri; puis on ensemence en surface.

Après 15 heures à 37°, les colonies de Colibacilles rougissent au centre; après 24 heures, elles sont entièrement colorées avec un reflet verdâtre.

§ VII. — *Procédés au vert malachite*

D'après Loeffler, l'addition d'une certaine quantité de vert malachite aux milieux de culture empêche

le développement du Colibacille et est sans action sur la pousse des Bacilles typhiques.

Kiralyfi a montré que cette propriété n'était pas exacte, mais que, dans un tel milieu, un grand nombre de germes (Streptocoque, Staphylocoque, Vibriion cholérique, etc...) ne poussent pas. Il a proposé d'employer de tels milieux pour l'obtention de colonies pures de B. Coli et de de B. d'Eberth.

I. — *Technique de Leuchs.* — Préparer une gélose avec :

Viande de bœuf	500 gr.
Eau	1 litre
Sel marin	5 gr.
Dextrine	10 gr.
Gélose	30 à 40 gr.

Neutraliser au tournesol; ajouter 5 cc. de solution normale de carbonate de soude et 100 cc. de solution de nutrose à 10 p. 100. Filtrer, stériliser, puis additionner le milieu de 16 à 18 cc. de solution de vert malachite à 1 pour 100.

Le milieu — en boîtes Pétri — estensemencé en surface. Les colonies typhiques forment autour d'elles une zone jaunâtre caractéristique tranchant sur le vert du milieu.

II. — *Technique de Loeffler.* — Pour identifier une colonie suspecte obtenue par la méthode de

Leuchs, Loeffler en conseille l'ensemencement dans sa *solution typhique*. Elle est constituée par :

Eau distillée	1.000 cc.
Nutrose	1 gr.
Peptone	2 gr.
Glucose	1 gr.
Lactose	5 gr.
Solution à 2 0/0 de vert malachite	1 cc.
Solution normale de soude	1 cc. 5

Le B. d'Eberth y donne en 16 à 20 heures une coagulation : la masse liquide se prend en bloc et au-dessus surnage un liquide coloré en vert.

Le B. Coli produit non pas un coagulum homogène, mais une masse verdâtre adhérente aux parois du tube.

III. — *Technique de Peabody et Pratt*. — Ense-mencer dans du bouillon additionné de 1 pour 1.000 de vert malachite. Après un séjour à l'étuve de 18 h., faire des isollements sur plaques de Drigalski.

§ VIII. — *Procédés à la bile*

Ils utilisent les propriétés favorisantes de la bile pour les B. typhiques et les Colibacilles. La bile est employée seule : en nature ou à l'état de sels biliaires ou mélangée au vert malachite. On associe également

cette propriété avec les réactions fermentatives du *B. Coli* sur les sucres.

I. — *Procédé de Dunschmann.* — Préparer le milieu suivant :

Eau distillée	100 cc.
Gélose	3 gr.
Peptone	3 gr.
Lactose	3 gr.
Gélatine	1 gr.
Taurocholate de soude	1 gr.

— Après chauffage à 120°, filtration et répartition par fractions de 10 cc. dans des tubes à essai. On stérilise, puis à chaque tube on ajoute 1 cc. de teinture de tournesol.

Chaque tube sert à préparer une boîte de Pétri que l'on ensemence en surface.

II. — *Procédé de Jackson et Mélia.* — L'eau est enrichie en ensemencant une petite quantité dans 5 cc. de bile et en cultivant 24 heures à 37°.

On prépare ensuite une série de huit tubes à essai contenant 9 cc. d'eau stérile. Le premier reçoit 1 cc. de culture, le deuxième 1 cc. du premier, etc...

D'autre part, on a des boîtes de Pétri contenant 10 cc. de *gélose de Hesse*.

Extrait de Liebig	5 gr.
Peptone	10 gr.

Chlorure de sodium 8 gr. 50

Gélose 30 gr.

qu'on ensemence avec 1 cc. de culture prélevé dans chaque tube.

III. — *Procédés de Loeffler.* — a) Bile et vert malachite. Ensemencement sur plaques préparées avec de la gélose à la nutrose de Leuchs additionnée de 3 pour 100 de bile de bœuf et de 1,9 pour 100 d'une solution à 0,2 pour 100 de vert malachite.

b) Ce milieu ayant donné des résultats très inconstants, Loeffler préconise le milieu :

Gélose nutritive liquéfiée et refroidie à 45° 100 cc.

Bile de bœuf stérilisée 3 cc.

Solution aqueuse d'azoblu à 0,5 p. 100 1 cc.

Solution aqueuse de vert malachite à 0,2 p. 100 1 cc.

Le mélange coulé en boîtes de Pétri, on pratique un ensemencement en surface.

Sur ce milieu, le *B. typhique* donne des colonies bleues transparentes à reflets métalliques; le *Colibacille* produit des colonies opaques, rouges, sans reflet métallique.

IV. — *Procédé de Padlewsky.* — On ensemence sur des plaques préparées avec :

Eau distillée	100 cc.
Gélose	3 gr.
Peptone	2 gr.
Bile de bœuf	5 gr.
Lactose	1 gr.

Vérifier l'alcalinité, stériliser, refroidir à 65°

Ajouter d'abord :

Solution aqueuse à 1 p. 100 de

vert malachite 0 cc. 5

Bile de bœuf 0 cc. 5

Puis solution aqueuse de sulfite de sodium :

1 cc.

V. — *Procédé de Grisez et Pierret.* — Ce procédé est basé sur l'emploi d'un milieu favorisant (bile et glucose) et l'emploi de tubes à fermentation.

1° On prépare une solution mère :

Bile 900 cc.

Glucose 45 gr.

Eau (q. s. p.) 1.000 cc.

Dissoudre le glucose dans la bile et amener le volume à 1.000 cc. par addition d'eau distillée.

2° On prépare avec la solution mère trois dilutions :

a) Pour l'ensemencement de 1 cc.

Solution mère : 100 cc. Eau distillée : 700 cc.

b) Pour l'ensemencement de 5 cc.

Solution mère : 100 cc. Eau distillée : 500 cc.

c) Pour l'ensemencement de 10 cc.

Solution mère : 100 cc. Eau distillée : 350 cc.

3° Répartir les dilutions en tubes à cloche par 10 cc. et stériliser.

4° Ensemencer 1 cc. d'eau dans un tube *a*, 5 cc. dans un tube *b*, 10 cc. dans un tube *c*, puis porter à l'étuve à 37° 24 à 48 heures.

5° Ne pas tenir compte des tubes sans gaz; ense-mencer le contenu des autres en eau peptonée à 2 pour 100. 24 heures à 37°, puis faire les épreuves d'identification : indol, réduction du rouge neutre.

Un petit nombre de germes seraient susceptibles de se développer dans ce milieu en 48 heures en produisant des gaz. Les auteurs citent le Colibacille, le *B. paratyphique*, le *B. de Gaërtner*.

VI. — Plus simplement, on peut employer, sur le même principe, le milieu :

Bile de bœuf	100 cc.
Peptone	1 gr.
Lactose	1 gr.

sur lequel on peut ensemencer une grande quantité d'eau en employant seulement un volume restreint : 100 cc. pour 10 cc. par exemple.

Le colibacille se développe rapidement avec fermentation provoquant l'apparition d'une couronne de fines bulles de gaz.

Ce milieu serait particulièrement sélectif et donnerait pour les analyses d'eaux d'excellents résultats.

§ IX. — *Procédé d'Eigjkmann*

Le Colibacille, seul, ferait fermenter le glucose à 46°.

Ensemencer 100 cc. d'eau dans 15 cc. du milieu :

Glucose	10 gr.
Peptone	10 gr.
Chlorure de sodium	5 gr.
Eau	100 cc.

Placer ensuite 24 heures à 46° ; s'il existe du Colibacille, il se produit un dégagement gazeux. Pratiquer alors un isolement sur plaques de Drigalski.

Lorsque l'épreuve est négative, ensemencer d'abord l'eau en bouillon à 37°, puis reporter la culture en milieu sucré à 46°.

On a mis en doute la spécificité de cette propriété du Colibacille ; en outre, certains colibacilles ne donneraient pas une réaction positive.

§ X. — *Procédés utilisant des milieux colorés*

I. — *Gélatine colorée de Noeggerath.* — On mélange dans l'ordre suivant :

Bleu de méthylène	2 cc.
Violet de gentiane	4 cc.
Vert de méthyle	1 cc.
Chrysoïdine	4 cc.
Fuchsine	3 cc.
Eau distillée (q. s. p.)	200 cc.

On obtient une teinte brune tirant sur le bleu. On attend quinze jours. Il se produit des changements de coloration que l'on corrige en ajoutant l'une des couleurs précédentes.

VI à VIII gouttes sont nécessaires pour colorer un tube de gélatine.

Sur ce milieu, le B. d'Eberth donne des colonies violet évêque.

Sur *gélose fuchsinée de Gasser*, les colonies coliennes ont une teinte rouge voisine de celle des colonies typhiques.

Ramond emploie la gélose lactosée et colorée à la rubine. A la moindre trace d'acidité, il se produit une coloration rouge.

II. — *Procédé de Harrison*. — Cet auteur recommande le milieu :

Peptone de Witte	1 à 2 gr.
Taurocholate de soude	5 gr.
Esculine	1 gr.
Citrate de fer	0 gr. 05
Eau	100 gr.

avec 1,5 pour 100 d'agar si l'on veut un milieu solide.

Le B. Coli fait fermenter l'esculine (sucre plus esculétine), l'esculétine se combine au citrate de fer pour donner un sel brun noirâtre.

Le Colibacille noircit donc le milieu comme le B. lactis aerogenes.

On emploie 10 cc. de ce milieu pour 100 cc. d'eau et on cultive à une température de 37°5 à 40°.

III. — *Procédé au Neutral-Roth de Savage.* — Ce procédé est applicable à la recherche rapide du Colibacille et ne saurait déceler le B. d'Eberth.

Il utilise la réaction positive du B. Coli en présence de milieux au rouge neutre : virage au jaune canari et fluorescence.

Beaucoup d'auteurs ont montré que ce virage était sous la dépendance d'une production momentanée d'ammoniaque et qu'il était loin d'être spécifique de la présence du Colibacille. Ont les mêmes propriétés les Bacilles paratyphiques (Segale, Schottmüller, Sacquépée, Sicre et Vincent), le B. de Gaërtner (Aërtryck, Moersele), les B. du tétanos et de l'œdème malin (Rothberger), B. Cloacae (Ferrera, Hortu et Paredes), les Microbes de la fermentation ammoniacale (Rochaix et Dufourt), le B. fluorescens, certaines bactéries banales des eaux.

Par contre, d'après Sicre et Vincent, un certain

nombre d'échantillons de B. Coli décolorent à peine les milieux au rouge neutre.

On procède de la manière suivante :

Tout d'abord, on prépare un bouillon au rouge neutre en faisant cuire dans un demi-litre d'eau 125 gr. de bœuf. Après refroidissement, on ajoute :

Peptone Dufresne	10 gr.
Sel	10 gr.
Glucose	2 gr. 50

On ramène à 500 cc. On fait bouillir et, après refroidissement, on décante. Ensuite on ajoute 5 cc. de la solution :

Neutral-roth	5 gr.
Eau	100 cc.

30 minutes d'autoclave à 115°.

Le bouillon a une coloration rouge rubis. On le répartit dans des tubes d'Esmarch à raison de 6 à 20 cc. On ensemence avec 1, 5, 10, 15 et 20 cc. d'eau à analyser et on porte à l'étuve à 44°. Il se forme — s'il y a du Colibacille — des bulles gazeuses à la partie supérieure du bouillon qui devient fluorescent et jaune canari. Cette réaction apparaît en 48 heures; si elle ne se fait pas on peut affirmer que l'eau en cause ne renfermait pas de Colibacille en quantité appréciable.

IV. — *Procédé de Lacomme.* — Lacomme combine la méthode de Savage et celle d'Eijkmann :

réaction du rouge neutre et production de gaz en présence de solution glucosée.

Pour Lacomme, Rochaix et Dufourt, toute eau donnant ces réactions contiendrait du Colibacille.

A. Rochaix a proposé d'employer le rouge neutre non plus en vue de la recherche exclusive du Colibacille, mais de la découverte rapide de la contamination globale de l'eau par les microbes provenant des matières d'origine intestinale. L'indice de contamination concerne l'ensemble des germes faisant virer le rouge neutre.

On utilise le bouillon de Savage, privé de sucre, dans le but d'obtenir une réaction constante.

L'échelle à utiliser est la même que pour les méthodes ordinaires.

V. — *Second procédé de Besson.* — On prépare le milieu :

Peptone Chapoteaut 40 gr.

Eau 1 litre

On neutralise, on chauffe à 115°, on filtre, puis on ajoute :

Lactose pur 5 gr.

Solution aqueuse de rouge neutre

à 1 pour 100 4 à 5 cc.

Le mélange est réparti, par fractions de 15 cc., dans des tubes à essai contenant un tube à hémolyse renversé. On stérilise.

L'eau à analyser est distribuée à doses croissantes : un quart de cc., un demi cc., 4 cc., dans les tubes. On porte ensuite 18 à 24 heures à 37°.

Les tubes où il y a fluorescence et gaz sont comptées comme contenant du Colibacille; il est facile d'en déduire, suivant le tube, la teneur d'une eau en *B. Coli*

Ce procédé demande 24 heures et, en ce laps de temps, en dehors du Colibacille seul, le Pneumobacille de Friedlander donne une réaction positive.

Les *B. anthracomorphes* (*B. subtilis*, *B. mesentericus*), fréquents dans les eaux, réduiraient le rouge neutre, mais ne fermentent pas le lactose.

Les Bacilles du groupe *Bacillus fluorescens* (fluorescents divers, *B. pyocyaneus*) n'attaquent pas le lactose, mais produiraient une réduction plus ou moins marquée. Les vibrions des eaux, le vibron cholérique, ne réduisent pas le rouge neutre et n'attaquent pas le lactose. De même le *B. prodigiosus*.

Le *B. mucosus* attaque le lactose — sans gaz — et ne réduit pas le rouge neutre en eau peptonée lactosée : le contenu des tubes rougit par acidification.

Le *B. cloacae* attaque le lactose en donnant une très petite quantité de gaz et ne produit pas de réduction.

Les B. typhiques et paratyphiques n'attaquent pas le lactose; il en est de même du B. proteus, des B. dysentériques et des Urobacilles.

Les cocci des eaux, nombreux et variés, ne produisent pas de gaz en vie aérobie; aux dépens du lactose, un certain nombre donnent des acides et un virage à la teinte amarante; quelques-uns réduisent le rouge neutre.

§ XI. — *Procédé au bouillon lactosé*

Sur ce principe sont basées les méthodes standard américaines en vue de déterminer la présence et le nombre de germes appartenant au groupe coliaérogènes.

Tous les Bacilles ne prenant pas le Gram, non sporulés, fermentant le lactose et se développant à la surface de certains milieux solides, appartiennent à ce groupe.

Le milieu de base est constitué par :

Eau	1.000 cc.
Peptone	5 gr.
Extrait de bœuf	3 gr.
Lactose	0 gr. 5

L'analyse se fait en trois étapes.

I. — *Analyse présomptive.* — Le bouillon lactosé est réparti en tubes de Smith à fermentation de telle

manière que chaque tube contienne au moins deux fois plus de milieu nutritif que d'eau à étudier.

On ensemece plusieurs volumes différents; pour une quantité supérieure à 10 cc. on utilise autant de tubes de 10 cc. qu'il sera nécessaire.

On porte 24 à 48 heures à 37° et on lit les résultats :

a) Absence de formation gazeuse en 48 heures	} -résultat négatif
b) Formation gazeuse occupant moins de 10 pour 100 de la branche anaérobie en 48 heures	
c) 1) Formation gazeuse occupant plus de 10 pour 100 de la branche anaérobie en 48 heures (C ₁)	} analyse présomptive
En 24 heures (C ₂)	

Le résultat C₂ est tenu pour décisif.

Pour b et C₁, un supplément de recherche est nécessaire.

II. — *Analyse de confirmation.* — Partant des tubes ayant donné une analyse douteuse, on pratique un réensemencement sur milieu de Endo ou de Teague. Si, après 24 heures à 37°, il s'est développé des colonies types, l'analyse de confirmation est positive; sinon on procède au troisième temps.

III. — *Analyse complétée.* — Les plaques d'Endo

ou de Teague sont vues à nouveau après 24 heures d'étuve. On repique deux colonies, d'aspect type ou s'en rapprochant, en bouillon lactosé et sur gélose inclinée.

Sur le premier, on vérifiera l'apparition d'une fermentation gazeuse en 48 heures; sur le deuxième, en partant des tubes correspondant à ceux donnant la fermentation du lactose, on vérifiera qu'il s'agit d'un Bacille à Gram négatif et non sporulé. Ces trois caractères le feront classer comme Coliaérogènes.

Un procédé légèrement différent consiste à adjoindre de la teinture de tournesol au milieu lactose. On demande pour un résultat positif le dégagement de gaz et le virage de la coloration du milieu.

§ XII. — *Procédés au lait*

En utilisant les propriétés coagulantes des cultures de Colibacille pour le lait, on a proposé des méthodes de recherche basées uniquement sur cette réaction. D'autres utilisent le lait tournesolé, demandant alors à la fois coagulation et virage au rouge.

Cette réaction biologique ne peut suffire à caractériser la présence du B. Coli; d'autre part, les propriétés coagulantes des Colibacilles des eaux sont loin d'être constantes. En tout état de cause, on ne pourra se fonder suffisamment sur une telle méthode

pour le diagnostic bactériologique exact d'une eau à analyser.

§ XIII. — *Procédés à l'Indol*

Ils sont basés sur les propriétés indologènes d'une culture colienne en eau peptonée.

Ils utilisent cette seule propriété ou la combinent avec d'autres réactions du Colibacille.

I. — Le procédé le plus simple consiste à peptoniser à 1 pour 100 l'eau à analyser, puis à la répartir par fractions de 10 cc. en 10 tubes. Après 24 heures — ou de préférence 48 heures — d'étuve à 37°, on recherche la réaction de l'indol. Si elle est positive sur n tubes, on compte $n \times 10$ Colibacilles au litre.

II. — Un autre procédé combine la réaction de l'Indol à la fermentation du lactose.

Il utilise une eau peptonée à 6 p. 100 et phéniquée à 1,20 p. 1.000.

On ajoute l'eau à analyser à parties égales et on répartit en 20 tubes à raison de 10 cc. par tube. Après 24 heures d'étuve à 41°, on repique dans des tubes d'eau peptonée lactosée tournesolée contenant de petites cloches à gaz.

Après 48 heures d'étuve, on retire tous les tubes de la première série qui sont troubles et l'on recherche sur eux la réaction de l'Indol.

On note d'autre part les tubes où il y a fermentation du lactose avec gaz.

Le nombre de tubes ayant donné à la fois la double réaction sera considéré comme représentant le nombre de Colibacilles par 100 cc. d'eau à analyser.

Ces procédés — le premier surtout — sont d'une application très simple et pratique. Malheureusement la réaction de l'Indol est loin d'être symptomatique de la présence du Colibacille; elle est positive pour le Staphylocoque blanc de l'eau et de nombreuses bactéries indologènes de l'eau; elle est souvent négative alors que nous avons à faire à un Colibacille. On ne pourra donc en déduire une certitude ni dans un sens ni dans l'autre; on s'en servira surtout, avec les autres réactions habituelles, pour la caractérisation des germes isolés par un procédé quelconque.

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE PREMIER

La concentration des germes

Nous avons fait l'expérience suivante : 1 litre d'eau distillée contenant 4 gr. de chlorure d'aluminium est stérilisé, puis souillé, de façon qu'il contienne environ 1.000 B. d'Eberth. Une série de dilutions nous a permis d'obtenir une eau contenant 10.000 germes par centimètre cube; un dixième de cc. ajouté au litre précédent permet donc la souillure voulue.

A ce litre est ajouté de la lessive de soude a raison de 40 cc. de solution à 10 0/0. Il se produit un précipité abondant. On laisse décanter, puis on siphonne le liquide surnageant. Celui-ci est peptoné à 1 pour 100 et réparti dans des flacons et des tubes à raison de 100, 50, 10, 10, 5, 2 et 1 cc. et mis à l'ézuve à 37°.

La culture — tardive — n'apparaît que dans les flacons 100 et 50 à l'exclusion de quantités d'eau inférieures. Le nombre de germes non entraînés est donc environ de 20 par litre.

Ce procédé donne donc une bonne concentration de germes — 98 0/0 — mais il nécessite des manipulations supplémentaires longues et assez délicates. Par l'incertitude du pourcentage de la concentration, il ne permet pas d'établir une exacte numération des germes. S'il paraît s'imposer pour des cultures sur milieux solides, alors qu'il est impossible, pour des raisons matérielles, de cultiver directement un assez grand volume d'eau, il est superflu de l'employer pour des cultures en milieux liquides : l'instruction du 12 juillet 1924 prévoit que la recherche portera sur un volume d'eau de 100 cc. par débit de 50 litres seconde, lorsque nous faisons la numération sur un volume total de 176 cc. ($100+50+10+10+5+2+1$) cela correspond déjà à un débit horaire de $320\text{ m}^3\text{ 4}$ et journalier de $7.689\text{ m}^3\text{ 6}$, ce qui est déjà considérable.

CHAPITRE II

Nous avons étudié, dans les expériences dont l'exposé constituera ce chapitre, le développement des germes d'un même échantillon d'eau, dans des milieux phéniqués et non phéniqués. En même temps, nous avons recherché quels résultats on obtenait, pour ces mêmes échantillons, en employant des méthodes simples : indol, eau peptonée lactosée tournesolée, procédé de Besson. Nous exposerons ensemble tous ces résultats, qu'on ne peut séparer, nous efforçant pour chaque expérience de tirer une conclusion et des directives pour éviter les irrégularités et les erreurs.

Tout d'abord, indiquons la façon de procéder au peptonage et au phéniquage d'une eau :

Sur un échantillon de 180 cc., on prélève 50 cc. avec une pipette stérile et on les introduit dans une fiole. Cette eau est peptonée à 1 0/0 en utilisant une solution de peptone concentrée à la dose de 1 cc. pour 50 cc. d'eau. On prélève ensuite dans le premier flacon deux fois 10 cc. qui sont mis dans deux tubes stériles,

puis 5 cc., puis 2, puis 1 qui sont ajoutés à des tubes d'eau peptonée ordinaire à 1 pour 100 de façon à avoir un volume total suffisant. 2 cc. sont rejetés pour amener le volume du premier flacon exactement à 100 cc.

Le phéniquage du milieu à 0,84 p. 1.000 s'obtient en utilisant une solution d'acide phénique à 5 p. 100, à la dose de I goutte (XXX gouttes au gramme du compte-gouttes employé) pour 2 cc. d'eau peptonée. Il en faudra donc pour :

100 cc.	L gouttes
50 cc.	XXV —
10 cc.	V —
5 cc. (+ 10 cc.)	VIII —
2 cc. (+ 10 cc.)	VI —
1 cc. (+ 10 cc.)	V à VI —

Finalement, notre eau est peptonée à 1 pour 100, phéniquée à 0,84 pour 1.000 dans les volumes suivants : 100 - 50 - 10 - 10 - 5 - 2 et 1 cc. Ce qui correspond à 10, 20, 100, 200, 500 et 1.000 Colibacilles par litre.

§ I. — *Expérience n° 1*

Ce premier échantillon est réparti en deux séries — phéniquée et non phéniquée — et placé à l'étuve à 41°5.

Sur les cultures examinées au bout de 15 heures, on constate :

1° Dans les milieux non phéniqués, la présence — partout — d'un trouble prononcé avec voile.

2° Dans les milieux phéniqués :

Tubes 10 et 5 : trouble léger homogène sans voile.

Tubes 2 et 1 : trouble très léger avec ondes.

Un deuxième examen fait à la dix-huitième heure de culture donne :

1° Dans les milieux non phéniqués, le même aspect que précédemment.

2° Dans les milieux phéniqués, partout un trouble plus ou moins prononcé sans voile.

A chacun de ces examens, nous avons fait, pour tous les volumes, un repiquage sur gélose. Puis, partant des colonies ainsi obtenues, un repiquage en eau peptonée, en eau lactosée au rouge neutre (tubes B), sur gélose lactosée tournesolée et en tubes à lait.

L'examen fait au bout de 24 heures (48 heures du début de l'expérience) nous donne les résultats suivants :

1° *Cultures de 15 heures.* — a) En milieu non phénique, un développement microbien présentant les caractères morphologiques et les réactions de fermentation du **Colibacille**.

b) En milieu phéniqué des cultures qui ne présentent aucun de ces caractères.

2° *Cultures de 18 heures.* — Dans les milieux non phéniqués, le même résultat que pour les cultures de 15 heures; dans les milieux phéniqués, le *B. Coli* ne peut être mis en évidence par aucun de ses caractères.

Il est à constater que l'acide phénique a provoqué la disparition du *Colibacille* dans cet échantillon d'eau. Il est remarquable aussi que les cultures souillées d'impuretés dans lesquelles le *B. Coli* était bien visible au bout de 15 heures est, dans les cultures correspondantes de 18 heures, difficile à retrouver.

Enfin, les caractères indologènes vérifiés cadrent exactement avec les résultats précédents.

§ II. — *Expérience n° 2*

Un deuxième échantillon d'eau estensemencé en eau peptonée non phéniquée et phéniquée, en milieu de Besson, en eau peptonée lactosée.

On obtient les résultats suivants :

QUANTITÉS ensemencées	Milieu non phéniqué	Milieu phéniqué	Milieu de Besson	eau peptonée lactosée
100	Très trouble, sans voile. Quelques bulles Odeur fécaloïde <i>Pas d'indol</i>	Moins trouble Sans voile Pas d'odeur <i>Pas d'indol</i>	Réduction franche et rapide Dégage- ment abon- dant de gaz	
50	Très trouble, sans voile Odeur fécaloïde <i>Pas d'indol</i>	Moins trouble Sans voile Pas d'odeur <i>Pas d'indol</i>	Ni réduc- tion Ni gaz	Sur 10 tubes en- semencés avec 10cc d'eau cha- cun, tous ont donné une déco- loration du tour- nesol
10	Moins trouble Voile épais <i>Pas d'indol</i>	Trouble léger Voile abondant Grimpant sur les parois <i>Pas d'indol</i>	Ni réduc- tion Ni gaz	
10	Moins trouble Voile épais <i>Pas d'indol</i>	Trouble léger Voile <i>Pas d'indol</i>	Ni réduc- tion Ni gaz	Un a donné un dégagement abondant de gaz; un a donné un dégagement très léger de gaz.
5	Trouble léger Voile <i>Pas d'indol</i>	Trouble très léger, blanchâtre. Pas de voile <i>Pas d'indol</i>	Ni réduc- tion Ni gaz	
2	Très trouble Pas de voile Bords irisés <i>Pas d'indol</i>	Trouble très léger, blanchâtre. Pas de voile <i>Pas d'indol</i>	Ni réduc- tion Ni gaz	
1	Trouble très léger Petit voile <i>Pas d'indol</i>	Trouble très léger Voile <i>Pas d'indol</i>	Ni réduc- tion Ni gaz	

Ces cultures de 18 heures, repiquées sur gélose, nous donnent après 12 heures environ :

1° *Milieu non phéniqué.*

100 : Culture coliforme. Petit bacille faiblement mobile. Gram négatif.

50 : Culture coliforme (impure) constituée également d'un petit bacille peu mobile à Gram négatif.

10 : Culture coliforme d'un petit bacille peu mobile à Gram négatif.

5 et 2 : Même aspect à l'examen macroscopique et microscopique.

1 : Culture en grandes colonies plates et sèches. Bacille de grande taille à Gram positif.

2° *Milieu phéniqué.*

100 : Culture en grandes colonies plates envahissantes. Gros bâtonnets à extrémités carrées. Gram positif.

50 : Culture en grandes colonies plates envahissantes. Bacilles en longs filaments. Gram positif.

10 : Culture en grandes colonies plates envahissantes. Bacille Gram négatif *sporulé*.

10' : Culture en grandes colonies plates envahissantes. Grand bacille Gram positif.

5 : Voile corné et sec. Grand bacille Gram positif.

2 : Colonies petites, sèches, de couleur jaunâtre.

Bacille de morphologie comparable au Colibacille, mais possédant des spores terminales.

1 : Voile corné et sec. Grand bacille Gram négatif.

Repiquées sur gélose lactosée tournesolée, tubes B et eau peptonée pour Indol, les cultures nous donnent :

	MILIEU NON PHÉNIQUÉ					MILIEU PHÉNIQUÉ				
	Tube B		Gélose lactosée tournesolée		Indol	Tube B		Gélose lactosée tournesolée		Indol
	Réduct.	Gaz	Virage	Gaz		Réduct.	Gaz	Virage	Gaz	
100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0
10	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0
10'	+	+	+	+	0					
5	+	+	+	+	0					
2	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0

Les germes isolés des milieux non phéniqués, outre qu'ils ont tout à fait l'apparence morphologique, la mobilité et les affinités tinctoriales du Colibacille, en présentent les réactions caractéristiques.

Pour l'instant, ne retenons de cette expérience que les différences trouvées entre les résultats obtenus dans les milieux phéniqués et non phéniqués.

Ici, comme dans la première expérience, le Colibacille a disparu sous l'influence de l'acide phéni-

que; pourtant, dans les deux cas, on est arrivé à l'isoler en quantité très appréciable — 1.000 et 500 au litre — en s'abstenant de faire usage d'un antiseptique. Sans doute s'agissait-il d'un germe ayant perdu, par son séjour dans l'eau, une partie de ses qualités, en particulier sa résistance à l'action inhibitrice de l'acide phénique.

§ III

L'action de l'acide phénique n'est d'ailleurs pas toujours aussi marquée.

Voici un échantillon d'eauensemencé suivant la technique habituelle en deux séries : phéniquée et non phéniquée.

Après dix-huit heures de culture, on constate :

1° Dans les milieux non phéniqués, partout existence d'un trouble allant du très prononcé pour 100 à une opacité plus atténuée pour 1. Partout des grumeaux; des voiles, irrégulièrement.

2° Dans les milieux phéniqués, partout également trouble très prononcé; des voiles sur les tubes 100, 50 et 2.

Les cultures très souillées obtenues après repiquage sur gélose sont reportées sur milieux différentiels et nous donnent :

	Milieu non phéniqué		Milieu phéniqué	
	Tube B	Indol	Tube B	Indol
100	0	0	0	0
50	0	0	0	0
10	+	-	-	+
10'	++	+	+	+
5	++	+	+	+
2	0	+	0	0
1	+	+	0	0

Il est à remarquer que le Colibacille a bien poussé dans les milieux phéniqués, mais que sa présence se manifeste plus loin — dans le tube 1 certainement, dans le tube 2, avec une réaction de Besson douteuse, probablement — en milieu non phéniqué.

D'autre part, l'absence de B. Coli dans les grandes quantités d'eauensemencées peut s'expliquer, nous semble-t-il, par le fait que nous étions en présence d'un échantillon très souillé; la surabondance des germes a fait disparaître le Colibacille sous l'influence de la concurrence vitale.

§ IV

Venant s'ajouter au même processus, l'acide phénique ne serait-il pas la cause d'irrégularités dans la

présence ou l'absence du Colibacille suivant les volumes d'eauensemencés ?

Voici une eau qui nous donne en milieu peptoné ordinaire, régulièrement des tubes 100 à 2, des colonies de bacilles ayant l'aspect morphologique et les réactions du B. Coli. Ensemencée en milieu phénique, tous les tubes donnent en dix-huit heures un trouble homogène.

Sur gélose, l'aspect des colonies est le suivant :

100 : nappe grumeuleuse opaque.

50 : colonies coliformes.

10, 10', 5, 2, 1 : nappe grumeuleuse opaque.

Par les milieux d'identification, gélose lactosée tournesolée, tubes Besson et eau peptonée à 1 0/0 pour Indol, nous avons :

	Gélose lactosée tournesolée		Tube B			Indol
	ferment.	gaz	Réd.	gaz		
100	+++	+	0	0		++
50	+	0	0	0		0
10	+++	+++	très incomplète	+++		++
10'	+	+	0	0		+
5	++	++	++	0		0
2	0	0	+	0		0
1	0	±	0	+		0

La recherche de l'Indol sur les premières cultures n'était positive que pour les tubes 10 et 1.

Les colonies isolées ne permettent pas de faire une colimétrie précise. La réaction de l'Indol non plus. Notons que l'échantillon semblant contenir le plus certainement du Colibacille (10) ne donne pas de réaction de l'Indol sur le premier bouillon, mais la donne nettement sur le repiquage. Nous reviendrons ailleurs sur ce fait.

Il nous semble que ces résultats constituent un exemple de perturbation profonde apportée dans la colimétrie par l'introduction d'un antiseptique. 10 ou 200 Colibacilles au litre ?

§ V

Sur l'échantillon n° 3 — 1.000 Coli-litre dans les milieux ordinaires et 200 dans les milieux phéniqués — et sur une autre eau nous donnant dans les mêmes conditions 1.000 et 500 B. Coli — nous avons pratiqué la méthode de Vincent des trois passages en milieux phéniqués à 1 pour 1.000.

Toutes les cultures au deuxième et au troisième passage sont troublées de façon homogène et présentent des ondes et parfois des voiles. Pourtant, repiquant sur gélose et sur milieux différentiels, nous

n'avons pu mettre en évidence la présence du *B. Coli* : l'examen des cultures ne décèle pas de colonies coliformes, ne permet pas de trouver sous le microscope de bacilles ayant les caractères morphologiques du Colibacille. Aucune réaction d'indol positive, aucun virage ou dégagement de gaz au tube B. Toujours nous avons retrouvé des cultures abondantes de souillures dont la principale semble être constituée par un bacille du genre *Subtilis*.

Nous avons perdu par des repiquages successifs un bacille résistant pourtant à l'action de l'acide phénique puisqu'il existait encore abondamment dans le premier bouillon phéniqué — mais toujours nous avons réensemencé les germes que nous voulions éliminer.

Ceux-ci sont peu sensibles à l'action de l'acide phénique.

Dans deux séries de tubes contenant 10 cc. d'eau peptonée à 1 pour 100 et, O, II, IV, etc., XX gouttes de solution d'acide phénique à 5 pour 100, on ensemence un Colibacille et une souillure, isolés d'une des eaux précédentes et non encore habitués aux milieux phéniqués.

Après 24 heures d'étuve à 41°5, on trouve, à l'examen des tubes, l'absence de pousse du *B. Coli* au tube VIII; la souillure cultive encore dans le tube XIII.

Donc, une dose de 1,33 pour 1.000 d'acide phénique a fait disparaître notre Colibacille; il nous a fallu 2,33 pour 1.000 d'antiseptique pour agir sur notre germe banal.

Le résultat de cette expérience vient confirmer ce que nous laissait supposer les expériences précédentes. Pourquoi employer un antiseptique qui nous laisse, après trois passages dans un milieu le contenant, les mêmes souillures que dans une culture en milieu nutritif ordinaire ?

Combien il serait vain de vouloir faire le diagnostic bactériologique d'une eau sur la simple existence d'un trouble homogène après deux repiquages successifs en milieu phéniqué.

Pourquoi donc employer ces trois passages sans utilité apparente et ne pas faire l'isolement (il faut toujours y arriver) dès la première culture ?

Cet emploi d'un antiseptique n'est, en outre, pas sans inconvénient. Rappelons que, sur deux échantillons d'eau, il a éliminé le Colibacille; sur un autre, il a réduit l'étendue de son apparition et que, sur un dernier enfin, son emploi est peut-être la cause de résultats irréguliers.

Aux doses employées (1 pour 1.000), l'action inhibitrice de l'acide phénique sur un Colibacille, ayant

séjourné parfois longtemps dans l'eau et, par ce fait, amoindri dans sa vitalité — et dans ses propriétés biologiques — est certaine.

Ces faits ont été signalés par beaucoup d'auteurs; ils leur ont fait abandonner l'addition de tout antiseptique à leurs milieux de culture.

Nous estimons qu'il est sage de les imiter.

CHAPITRE III

§ I

Avant d'étudier les « procédés simplifiés », ajoutons à notre documentation les résultats de l'analyse d'une eauensemencée selon quatre méthodes.

1° au bout de 24 heures	Eau peptonée non phéniquée	Eau peptonée phéniquée	Milieu de Besson	Eau peptonée lactosée
100	Trouble léger-voile	Aucune pousse	Amarante-Gaz	Aucun phénomène à noter
50	Trouble léger-voile	»	Amarante	
10	Aucune pousse	»	Amarante	
10'	»	»	Amarante	
5	»	»	Inchangé	
2	»	»	»	
1	»	»	»	
2° au bout de 40 heures				
100	Voile corné clair Pas d'odeur Pas d'indol	Trouble Pas d'odeur Pas d'indol	Virage Gaz Fluorescence Odeur putride	Aucun phénomène à noter
50	id.	Aucune pousse	Virage Fluorescence Pas de gaz	
10	Trouble léger, pas de voile	»	Amarante Gaz	
10'	Aucune pousse	»	Orange Gaz	
5	»	»	Rouge Gaz	
2	»	»	Rouge Gaz	
1	»	»	Amarante Pas de gaz	

On repique sur gélose en partant des ensemencements de 40 heures en milieu non phéniqué, en milieu phéniqué et en milieu de Besson. Voici les résultats de ces cultures après 12 heures environ.

1° *Milieu non phéniqué.* — Seul le tube 10 donne une colonie coliforme. Au microscope : petit bacille plus long et plus fin que le B. Coli, *très mobile* (plus que ne l'est habituellement le Coli), Gram négatif, groupement en dispositions parallèles.

Bacille fermentant le lactose, mais donnant une culture faible en eau peptonée et pas d'indol.

2° *Milieu phéniqué.* — Le seul développement apparu (100) nous donne, sur gélose, de grandes colonies plates dentelées en forme de corolles de fleurs. Ses éléments sont constitués d'un gros bacille à spore centrale.

3° *Milieu de Besson.* — Tous les tubes ont été, après 40 heures, le siège d'une réaction : virage, changement de teinte, gaz.

Les colonies sur gélose se présentent ainsi. Pour :
100 : Enduit de petites colonies extrêmement fines et rapprochées, émaillées de colonies plus opaques, franchement jaunes.

Microscope : bacille Gram positif; coccus Gram négatif.

Ce dernier germe ne fermente pas le lactose et ne donne pas d'indol.

50 : Petites colonies translucides ressemblant assez à du B. Coli contenant des impuretés.

L'impureté est un gros bacille Gram positif.

Les petites colonies sont formées d'un cocobacille légèrement mobile, Gram négatif.

10 : Grandes colonies plates jaunâtres, aspect franchement crémeux.

Bacilles (Gram positif) et cocobacilles (Gram négatif) faiblement mobiles. Ces derniers ne fermentent ni ne virent le lactose tournesolé et ne donnent pas d'indol.

10' : Comme pour 100, grosses colonies de bacilles Gram positif et fines colonies de cocci Gram négatif.

5 : Colonies coliformes, mais très confluentes, tendance au développement en nappe.

Petit coccobacille (presque coccus) très faiblement mobile à Gram négatif.

Pas de fermentation du lactose, pas de production d'indol.

2 : Colonies voisines du Colibacille, un peu plus fines et confluentes.

Tout petit coccobacille faiblement mobile à Gram négatif, ne produisant pas d'indol.

1 : Petites colonies claires et grandes colonies grenues.

Ces dernières sont constituées de grands filaments à Gram positif. Les petites colonies ont pour

élément un bacille Gram négatif, plus gros que ne l'est habituellement le B. Coli et affectant un groupement en dispositions parallèles.

Nous avons obtenu sur milieu phéniqué des germes n'ayant aucune analogie avec le B. Coli, sur milieu non phéniqué la culture d'un bacille morphologiquement non colibacillaire et, sur milieu de Besson, une pousse dans les quantités 100, 50, 10, 10', 5, 2 et 1.

Le résultat des contrôles effectués sur ces cultures — et dont nous avons cité une partie — est le suivant :

Quantité ensemencée et milieu choisi au 1 ^{er} ense- mencement	Gélose lactosée tournesolée	Tube B	Lait	Eau peptonée
	<i>Ferment. - Gaz</i>	<i>Virage-fluor-gaz</i>		
100 (B)	O O	» » »	»	»
50 (B)	O O	Orange O O	Coagulation en masse	Pas d'indol
10 (N.P.)	+ (légère) O	O O O	O	Pas d'indol
10 (B)	O O	Orange O +	Coagulation forte Rétraction intense et rapide du caillot	Pas d'indol
10' (B)	O O	O O +	Coagulation forte Rétraction rapide du caillot	Pas d'indol
5 (B)	O O	O O +++	Coagulation forte Rétraction intense et rapide du caillot Coag. très forte Rétraction très in- tense du caillot	Pas d'indol
2 (B)	O O	O O +++	Transudation très rapide et très abondante du sé- rum	Pas d'indol
1 (B)	+++ + (léger)	O O O	O	Pas d'indol

Les germes qui ont produit ces réactions de contrôle ont été vérifiés au microscope. Partout où nous avons primitivement des impuretés, celles-ci ont été éliminées au cours du deuxième repiquage. Donc, nous n'étudions, exclusivement, dans le tableau précédent le germe qui avait appelé primitivement notre attention.

Voici les résultats du contrôle microscopique :

	1 ^{er} repiquage (le germe étudié est souligné)	2 ^e repiquage
100 (B)	1) Bacille, Gram positif 2) <i>Coccobacille, Gram négatif</i>	Coccobacille très faiblement mobile. Gram négatif
50 (B)	1) Grand bacille. Gram positif 2) <i>Très petit coccobacille faiblement mobile, Gram négatif</i>	Très petit coccobacille, Gram négatif, faiblement mobile
10 (N.P.)	<i>Bacille nettement plus long et plus fin que ne l'est le Coli. Beaucoup plus mobile</i>	
10 (B)	1) Grand bacille, Gram positif 2) <i>Petit coccobacille, Gram négatif</i>	Petit coccobacille. Gram négatif
10' (B)	1) Gros bacille, Gram positif 2) <i>Petit coccobacille, Gram négatif</i>	Petit coccobacille faiblement mobile. Gram négatif
5 (B)	<i>Tout petit coccobacille, Gram négatif</i>	Petit coccobacille. Gram négatif
2 (B)	<i>Tout petit coccobacille faiblement mobile. Gram négatif</i>	Tout petit bacille à mobilité assez marquée, mais sur place
1 (B)	1) Grands filaments Gram positif 2) <i>Bacille Gram négatif un peu plus grand que ne l'est habituellement le B. Coli</i>	Bacille de dimensions un peu supérieures à celles du B. Coli. Complètement immobile

En conclusion : partout, la culture précoce nous avait démontré l'absence de *B. Coli* et les contrôles ne démentent en aucun cas le premier diagnostic posé. Il est intéressant de remarquer en passant l'action nettement favorisante des composants du milieu de Besson (et très probablement du glucose) sur la pousse d'une flore spéciale de germes à morphologie cocco-bacillaire ayant comme principal caractère de coaguler fortement et rapidement le lait.

Le Besson nous a donné deux réactions entièrement positives (100 et 10) alors que le germe en cause n'était pas un *B. Coli*.

§ II

Nous n'avons que peu l'expérience des procédés à l'eau peptonée lactosée — tournesolée ou non — la seule comparaison que nous ayons faite (exp. n° 2) nous donne un résultat de 10 *Coli*, alors que nous en isolons 500. Par contre, sur une eau ne contenant pas de *Coli*, ce procédé donne aussi un résultat négatif.

Cette propriété de fermenter le lactose avec dégagement de gaz ne semble pas constante chez les *B. Coli* des eaux.

Remarquons comme, dans les vérifications elles-mêmes, elle est souvent absente ou se manifeste incomplètement.

N'oublions pas non plus qu'elle est loin d'être

spécifique du Colibacille. Un tel procédé, basé à la fois sur une propriété inconstante d'une part et non spécifique d'autre part, ne saurait, à notre avis, être retenu.

§ III

Nous avons plus d'éléments pour apprécier les procédés à l'Indol.

La réaction de l'indol se recherche très simplement en ajoutant à une culture — en eau peptonée — 1 cc. de solution de nitrite de potassium à 0,02 pour 100, puis 1 cc. d'acide sulfurique pur dilué au quart (réaction de Salkowski). On peut rendre plus évidente la coloration rose obtenue en la rassemblant à l'aide de quelques centimètres cubes d'alcool amylique.

Mais suivant que cette réaction nous donne un résultat positif ou négatif, pouvons-nous en déduire qu'il y a ou qu'il n'y a pas de B. Coli ?

1° *Positive*. — Le staphylocoque blanc de l'eau, des bactéries putrides (dont la signification est sensiblement la même que celle du Colibacille) et des bactéries indologènes, n'ayant aucun point commun avec le Coli, la donnent.

2° *Négative*. — Si nous nous reportons à nos résultats nous trouvons qu'une eau contenant 500 Coli (expérience n° 2) ne nous a pas donné d'Indol, une eau contenant certainement du coli (§ IV) ne donne

une réaction positive qu'aux tubes 10 et 1, enfin qu'une eau ne contenant pas de Coli (dernier échantillon) ne donne pas d'Indol. Nous y voyons aussi (n°1, n° 3) que cette réaction a été en concordance avec les résultats de l'isolement.

En examinant plus attentivement les résultats, nous voyons que pour l'analyse n° 4, la réaction de l'Indol qui n'avait été positive sur les premiers bouillons que dans les tubes 10' et 1, apparaît sur les repiquages au tubes 100 et 10. L'expérience n° 2 nous montre que l'Indol qui n'apparaissait pas dans les premières cultures, peut être mis en évidence dans le tube 100 des repiquages.

Il semble que cette propriété indologène du Colibacille soit inconstante, mais que le germe cultivé longtemps — (d'où l'intérêt d'attendre 48 h. ou 4 jours) — récupère cette propriété qu'il avait perdu par son séjour dans l'eau.

§ IV

Le procédé de Besson nous a donné, en général, des résultats un peu inférieurs à ceux donnés par l'isolement du colibacille ; mais il est des cas où il est franchement en défaut soit qu'il pêche par excès (dernier échantillon analysé) ou par défaut (eau n° 2).

Remarquons que dans cette dernière analyse les

repiquages, en tubes B, donnent partout une réaction franche.

Le colibacille en cause avait-il perdu ses qualités fermentatives et sa propriété de faire virer le rouge neutre ? ou bien est-ce parce que se trouvant à l'état pur et en quantité considérable, la seconde fois, que la réaction s'est produite facilement ?

Il nous semble que l'on peut expliquer ces résultats par le fait qu'un colibacille qu'on retire d'une eau n'est pas analogue à un B. Coli cultivé au laboratoire. S'il se présente sous la même morphologie, les propriétés fermentatives ou la propriété indologène sont fréquemment absentes. Elles peuvent réapparaître à la suite de passages sur divers milieux.

§ V

Le résultat le plus déconcertant que puissent donner les techniques simplifiées ou les méthodes qui visent à assimiler la colimétrie à une colorimétrie — et également les procédés franchement « truqués » au moyen d'antiseptiques — est la constatation d'un colibacille authentique et certain dans de faibles quantités d'eauensemencées et son absence dans des quantités 20, 50 ou 100 fois supérieures.

Ce phénomène paradoxal peut cependant s'expliquer :

Si le colibacille existe dans 20, 10 ou 5 cc. d'eau il existe sûrement dans 50 et 100 cc., mais l'abondance des germes associés le fait passer inaperçu. Comment quelques unités colibacillaires parviendraient-elles à réduire de façon complète 200 cc. de bouillon au rouge neutre alors qu'elles se trouvent en concurrence vitale avec une profusion de microorganismes acidifiant le milieu ? Pourtant l'observateur conclura à l'absence du *B. coli* dans l'échantillon d'eauensemencé et attribuera le virage intense obtenu dans une plus petite quantité à l'effet du hasard !

Cet inconvénient majeur, l'inconstance des propriétés sur lesquelles se base tout procédé posant le diagnostic de présence du colibacille sur l'apparition de l'une de ses réactions biologiques, sous l'influence qui est supposé le contenir, nous feront rejeter de telles méthodes.

Il ne sera qu'un moyen certain de diagnostic, c'est d'obtenir par l'isolement une souche du germe en cause, d'en étudier la morphologie et les affinités tinctoriales et, plus accessoirement, d'en rechercher les réactions de différenciation (elles sont plus constantes dans les repiquages que dans les premières cultures) sans s'attacher à en exiger la concordance absolue.

CHAPITRE IV

Nous venons de voir les inconvénients des méthodes dites « simplifiées », se basant sur une réaction colorée ou une propriété spécifique — ou réputée telle — du colibacille.

Précédemment nous avons abandonné l'usage de l'acide phénique pour l'élimination des souillures et la mise en évidence — élective — du B. coli.

Nous avons aussi attribué aux repiquages successifs de milieux liquides à milieux liquides, la perte d'un germe existant dans la première culture et qu'il est impossible de mettre en évidence après le 3^e passage.

Nous avons insisté sur la nécessité qu'il y a à isoler le colibacille et à en faire un examen microscopique direct, en chercher les réactions habituelles mais sans trop se laisser influencer par des résultats irréguliers ou des propriétés absentes qui peuvent réapparaître après un certain temps de culture.

De plus nous savons qu'à cette température de 41°5-42° les cultures de colibacilles sont des premières

à apparaître et qu'il y a avantage — 1^{re} expérience — à en faire le repiquage le plus précocement possible.

Si nous voulons nous résumer, il nous faut :

- 1° Ne pas employer d'antiseptique ;
- 2° Isoler le *B. coli* ;
- 3° En faire l'examen direct après culture, puis en rechercher les réactions d'identification habituelles.

Nous procédons ainsi :

1° Un échantillon après peptonage à 1 pour 100 — en utilisant, à la dose de 1 cc. pour 50 cc. d'eau, une solution de peptone concentrée — est réparti dans des ballons, fioles et tubes stériles dans les volumes suivants : 100 cc., 50 cc., 10 cc., 10 cc., 5 cc., 2 cc. et 1 cc. (ces trois dernières valeurs ajoutées à 10 cc. d'eau peptonée ordinaire stérile, pour un volume total suffisant) :

2° Après 15 à 18 heures d'étuve à 41°5, 42° on repique les tubes présentant un trouble sur gélose inclinée.

Cette opération doit être faite avec beaucoup de soins. Il faut se servir d'un fil et non d'une öse, le plonger à peine dans le milieu peptoné, puis bien laver l'extrémité du fil dans l'eau de condensation de la gélose et étaler ensuite le plus possible en frottant dans le sens transversal tout en retirant le fil. (Il y a

avantage à couler la gélose dans de grands tubes de 20 mm. de diamètre sur 20 cm. de longueur).

Après un étalement fait de cette façon, on peut voir à côté de colonies diverses et, notamment à côté de grosses colonies envahissantes, quelques colonies de coli plus ou moins nombreuses (quelquefois il n'y en a que de rares unités). Il est alors facile d'isoler le germe à l'état pur.

3° Il faut s'efforcer de faire un diagnostic de présomption sur l'aspect des colonies examinées à l'œil nu ou à la loupe.

Quand on trouve une colonie bien caractéristique, on la repique soigneusement si l'on craint les souillures envahissantes, et on regarde au microscope les germes qui la composent. Si on a l'aspect du colibacille : petit bâtonnet droit à bouts arrondis de 2 à 4 mm. de long sur 0 mm. 6 à 0 mm. 7 de large avec quelques formes en diplobacilles (et bien rarement de courtes chaînettes), mobilité moindre que le bacille typhique (plutôt mouvements de vibration, de giration sur place) — et si la coloration présente un Gram négatif et pas de spores, on peut identifier presque à coup sûr un colibacille. Les réactions de différenciation (quand elles veulent bien marcher) ne viennent que confirmer un diagnostic fait sur la gélose et au microscope.

Cette méthode est rapide : il faut 24 heures pour un diagnostic de présomption, 36 à 48 heures pour un diagnostic de certitude (avec les résultats obtenus sur milieux différentiels).

Elle met le colibacille sur un bon milieu de culture et le laisse se développer normalement à l'abri de toute substance inhibitrice.

Elle permet, à coup sûr, l'isolement du germe en cause et donne des réponses rigoureusement exactes lorsqu'elles sont positives. Lorsqu'elles sont négatives on peut affirmer qu'il n'existe pas de colibacille en quantité appréciable dans l'eau en cause. C'est en employant cette méthode concurremment avec d'autres procédés que l'on peut s'apercevoir combien on risque de laisser passer le *B. coli* même par la méthode basée sur le milieu de Besson (qui est une des meilleures) et surtout par les méthodes basées sur l'emploi d'antiseptiques.

Qu'on n'objecte point que cet isolement entraîne à des recherches longues puisqu'en opérant sur des milieux non additionnés d'antiseptique la première culture est vite obtenue et qu'on doit la repiquer dès son apparition. En réalité, cela occasionne moins de peine et moins de dépenses, fait passer moins de temps que de multiples repiquages en milieux préendus sélectifs ou différentiels. Le travail se fait sur-

tout au microscope — donc rapidement — et on ne cherchera les réactions habituelles que presque à coup sûr ; donc économie de milieux tels que, lactose tournesolé, eau peptonée au rouge neutre, lait, gélatine, etc.

Nous en proposons l'emploi, croyant que ce procédé présente sur les autres méthodes un avantage théorique et un avantage pratique si l'on veut exiger des résultats satisfaisants.

CONCLUSIONS

De cette étude sur la colimétrie des eaux, nous pouvons déduire un certain nombre de conclusions :

1° Les « procédés de concentration » ne permettent pas une colimétrie exacte.

Ils présentent une difficulté d'application du fait des appareils supplémentaires et des manipulations longues et délicates qu'ils nécessitent. De plus on ne sait pas exactement la quantité de germes entraînés par le précipité d'alumine (ou autre), car il reste dans le liquide surnageant, dans une portion du culôt qu'on n'a pu reprendre, un certain nombre de germes qu'on ne peut évaluer que très approximativement.

Tous ces procédés se terminent par une numération sur milieux solides dont les résultats sont souvent aléatoires : par exemple en milieux gélatinés on se heurte à des liquéfactions qui empêchent la numération.

Ils sont inutiles si l'on veut se servir de milieux liquides — il est rarement demandé d'opérer sur des quantités d'eau supérieures à celles employées dans les cultures directes.

2° Les procédés faisant usage d'un antiseptique — tel l'acide phénique — ne sont pas recommandables. Les expériences qui ont servi à les fonder ont

été faites sur des germes vivaces, doués de toute leur résistance et de toutes leurs qualités. Il en va tout autrement lorsqu'on s'adresse à des eaux naturelles ; le colibacille y a perdu souvent une partie de ses propriétés et devient très sensible à l'action de toute substance inhibitrice.

L'acide phénique nous semble ne pas donner des cultures moins souillées que celles faites dans les milieux simplement nutritifs ; mais il présente parfois le très grave inconvénient de tuer ou d'empêcher le développement de certains colibacilles des eaux.

Ces inconvénients sont encore plus marqués en utilisant le procédé de Vincent. L'usage prolongé de l'antiseptique, mais surtout les repiquages fréquents de milieux liquides à milieux liquides fait perdre souvent le colibacille (2 fois sur 2 dans nos expériences), alors que d'autres germes ont continué à pulluler.

3° Les méthodes simplifiées ne donnent pas une sécurité suffisante pour conclure : elles sont infidèles par excès ou par défaut.

Par excès si l'on veut considérer comme colibacille authentique toutes les cultures présentant certaines réactions du *B. coli*, dont ce germe n'a pas la propriété exclusive.

Par défaut si l'on se hâte de conclure à l'absence de *B. coli* sur l'absence des dites réactions ou encore si, en recherchant la coïncidence de plusieurs de ces

réactions, certaines d'entre elles viennent à manquer.

Les procédés à l'eau peptonée lactosée, tourne-solée ou non, sont trop inconstants pour qu'ils soient pris en considération.

Les procédés à l'indol — les plus simples — sont sujets à des causes d'erreurs. *Positifs*, il peut ne s'agir que de staphylocoque blanc de l'eau ou de bactéries indologènes autres que le B. Coli. *Négatifs*, il peut y avoir dans l'eau des colibacilles qui ont perdu momentanément cette propriété mais qui sont susceptibles de la recouvrer après un certain temps de culture.

Le procédé de Besson — plus fidèle — se trouve lui aussi en défaut de temps en temps. Nous donnant en général des résultats un peu inférieurs, il est parfois nettement insuffisant suivant les échantillons d'eau.

Il ne saura donc être employé comme procédé de certitude. La certitude exige d'une part de mettre les colibacilles dans de bonnes conditions de culture, d'autre part d'isoler une souche pour en caractériser la morphologie et en rechercher les réactions d'identification.

4° Pour répondre à ces conditions nous cultivons sur milieu peptoné ordinaire avec repiquage aussi précoce que possible (dès l'apparition de la pousse vers la 15^e heure et avec possibilité d'une révision après 24 ou 30 heures), sur gélose inclinée.

L'ensemencement, fait très largement, permet d'obtenir des colonies isolées qu'on s'efforce de reconnaître. Un examen microscopique, avec recherche des caractères morphologiques et tinctoriaux du colibacille, donne presque une certitude.

Un ensemencement sur milieux différentiels vient (lorsque les résultats concordent) apporter une confirmation à l'examen direct.

Cette méthode est basée :

a) Sur la non utilisation d'un antiseptique dont on peut redouter l'action inhibitrice ;

b) Sur l'apparition précoce de la culture du colibacille dans ces conditions de température ;

c) Sur le repiquage *immédiat* de cette culture sur gélose inclinée ;

d) Sur le diagnostic, à l'œil nu ou à la loupe, des cultures coliformes ;

e) Sur l'examen microscopique de la morphologie et des affinités tinctoriales des éléments de ces cultures plutôt que sur la recherche des réactions habituelles d'identification qui viendront corroborer — plus ou moins complètement — les résultats obtenus à l'examen microscopique.

Le tout demande 24 ou 48 heures au maximum pour obtenir un élément absolu de certitude.

L'interprétation de cette méthode est absolument comparable à celle de tous les procédés qui se pro-

posent de dénombrer les colibacilles par la plus petite quantité d'eau ensemencée qui a donné un développement microbien. Elle n'a, par conséquent, ni plus ni moins de précision à ce point de vue qu'une autre, mais elle permet de déceler plus vite et plus sûrement les colibacilles d'une eau.

Quelques analyses viennent mettre en valeur les résultats obtenus.

ÉCHANTILLONS	Milieux pheniques		Eau lactosee	Milieu de Besson	Eau peptonee pour Indol	Procede personnel
	1 passage	3 passages				
I	0	»	»	»	1.000	1.000
II	0	»	10	10	0	500
III	200	0	»	100	»	1.000
IV	—	»	»	»	100 ou 1.000	500
V	500	0	»	500	»	1.000
VI	0	»	0	10 ou 100	0	0
VII	»	»	»	0	»	20

Vu : Le Doyen Vu : Le Président de la Thèse
A. ROUSSY L. TANON

Vu et permis d'imprimer
Le Recteur de l'Académie de Paris :
S. CHARLÉTY.

BIBLIOGRAPHIE

- BESSON A. — Technique microbiologique et sérothérapique (Baillière 1914 et 1928).
- BEZANÇON F. — Précis de microbiologie clinique (Masson, 1920).
- CALMETTE, BOQUET et NÈGRE. — Manuel technique de microbiologie et sérologie, 1933.
- CLOGNE R. — Analyses médicales pratiques (Le Français, 1930).
- COURMONT J. — Précis de bactériologie (Doin, 1926).
- COURMONT P. et ROCHAIX A. — Précis d'hygiène (Masson, 1921).
- DOPTER et SACQUÉPÉE. — Bactériologie.
- LANGERON M. — Microscopie.
- MARTIN, BROUARDEL, LAUNAY, MARTEL et BONJEAN. — Traité d'hygiène (Baillière, 1925).
- PHILIBERT A. — Précis de bactériologie.
- ROUX G. et ROCHAIX A. — Précis de microbie et de technique bactérioscopique. (Maloine, 1911).
- TANON. — Hygiène. (Maloine).
- DIÉNERT et ETRILLARD. — Sur la recherche du B. coli dans les eaux. (*Annales de l'Institut Pasteur*, mars 1931).

DIÉNERT et ETRILLARD. — Recherche et numération directe sur milieu solide du *B. coli* contenu dans un grand volume d'eau. *Annales de l'I.P.*, octobre 1929.

MINKEVICH. — Indol fermentation methods in estimates of *Bacillus Coli* in drinking water. *Zentralblatt für Bakt.*, pp. 338-346, 7 février 1928.

F. SIEKE et P. KEIM. — Über die Brauchbarkeit der Indolprobe zur Trink und Gebranchswasserkontrolle. *Arch. f. hyg.*, pp. 44-47, 1928.

GREER F.-E. — Sanitary significance of lactose fermenting bacteria not belonging to *B. Coli* group, factors influencing survival of microorganisms in water. *Journal Inf. Dis.*, 1928, pp. 545 à 550 et 551 à 555.

GREER F.-E. — Sanitary significance of lactose fermenting bacteria not belonging to *B. coli* group ; groups reported in the literature and isolated from water in Chicago. *Journal Inf. Dis.*, pp. 501 à 524, mai 1924.

GREER et NYHAN. — Sanitary significance of lactose fermenting bacteria not belonging to *B. coli* group, bacterial associations in cultures containing lactose fermenting bacteria. *Journal Inf. Dis.* p. 525 à 536, juin 1928.

GREER, NOBLE, NYHAN et NEIL. — Significance of lactose fermenting organisms not belonging to *B. coli* group ; mediums and methods. *Journal Inf. Dis.* p. 556 à 567, juin 1928.

WINSLOW C.-E.-A. — Standard methods and new procedures for isolation of Colon Bacilli from water. *Am. Journal Public Health*, pp. 446 à 469, mai 1934.

LITTERER W. — Simplified procedure in determining *B. coli* in water (presumptive test). *Am. Jour. Public Health*, pp. 491 à 494, avril 1928.

MINKEVICH et ROGOSIN. — Coagulation of milk used as indication for presence of *B. coli* in water. *Zentralblatt für Bakt.*, pp. 159 à 161, mars 1932.

THOMPSON R. E. — Irregularities in tests for *B. coli* in water. *Journal Bacter.*, pp. 209 à 221, mars 1927.

